

Tesi doctoral presentada per En/Na

**Marta PUIGMULÉ RAURICH**

amb el títol

**"Caracterització dels sistemes renals de ratolí i humà  
(PCT3 I HK-2). Mecanismes moleculars implicats en la  
nefrotoxicitat produïda per la CsA en el túbul proximal  
renal"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 29 de maig de 2008

Facultat de Biologia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



# MATERIALS



# 1. LÍNIES CEL·LULARS

## 1.1. CÈL·LULES

Les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball han estat les següents:

### **PKSV-PCT, PKSV-PR**

La PKSV-PCT i la PKSV-PR són línies cel·lulars epitelials immortalitzades derivades del segment contornejat (*pars convoluta*, PCT) i del segment recta (*pars recta*, PR) del túbul proximal renal de ratolí. S'han obtingut a partir de ratolins transgènics per l'antigen T-gran i t-petit del virus del simi 40 (SV40) sota el control de la piruvat quinasa (Cartier N. et al., 1993).

Ambdues línies cel·lulars presenten morfologia epiteloide, són cèl·lules adherents, creixen formant monocapes, i posseeixen la capacitat de formar domes després de varis dies de post confluència (Lacave R. et al., 1993). Aquestes línies cel·lulars han estat cedides pel Dr. Alain Vandewalle.

Aquestes línies cel·lulars van ser clonades per dilució límit obtenint així les cèl·lules PCT3 (PKSV-PCT clon 3) i les cèl·lules PR10 (PKSV-PR clon 10). Aquestes línies cel·lulars mantenen les mateixes característiques que les cèl·lules parentals de les quals provenen (Soler M. et al., 2002).

### **HK-2**

HK-2 és una línia cel·lular epitelial immortalitzada derivada de ronyó humà. S'ha obtingut a partir de la transducció dels gens E6/E7 dels virus del papiloma humà 16 (HPV16) en cèl·lules tubulars proximals humanes (PCT) (Ryan M.J. et al., 1994). Les cèl·lules HK-2 són adherents i creixen formant monocapes.

Aquesta línia cel·lular va ser comprada a *American Type Culture Collection* (ATCC), nº catàleg CRL-2190.

### **HeLa**

HeLa és una línia cel·lular epitelial, derivada de cèrvix humà adenocarcinomatós. Conté seqüències del virus del papiloma humà 18 (HPV-18). Aquesta línia cel·lular va ser comprada a *American Type Culture Collection* (ATCC), nº catàleg: CCL-2.

## 1.2. MEDIS DE CULTIU

## Medi PCT3/PR10

COMPONENT	CONCENTRACIÓ	PROVEÏDOR	REFERÈNCIA
DMEM	50 % (v/v)	GIBCOBRL	11880
Ham's-F12	50% (v/v)	GIBCOBRL	31765
HEPES	20 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-028-13
Glutamina	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
D-(+)-Glucosa	12.5 mM	SIGMA	G-7025
Transferrina	5 µg/ml	SIGMA	T-1438
Insulina	5 µg/ml	SIGMA	I-6634
Dexametasona	50 nM	SIGMA	D-8893
Triiodotironina	1nM	SIGMA	T-5516
EGF	10 ng/ml	SIGMA	E-4127
Selenat de sodi	30 nM	SIGMA	S-9133
Sèrum fetal boví	2 % (v/v)	GIBCOBRL	04-007-1A
Penicil·lina/ Estreptomicina	100 µg/ml 100 U/ml	GIBCOBRL	15240-062

## Medi HK-2

COMPONENT	CONCENTRACIÓ	PROVEÏDOR	REFERÈNCIA
<i>Keratinocyte-Serum Free Medium</i>	1:1	GIBCOBRL	17005-042
EGF recombinant	5 ng/ml		
Extracte de pituitària bovina	0.05 mg/ml		

## Medi HeLa

COMPONENT	CONCENTRACIÓ	PROVEÏDOR	REFERÈNCIA
DMEM <i>High glucose</i>	1:1	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-055-1A
Glutamina	2mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
Piruvat sòdic	1% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-042-1
Aminoàcids no essencials	1% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-0340-1B
Sèrum fetal boví	10% (v/v)	GIBCOBRL	04-007-1A
Penicil·lina/ Estreptomicina	100 U/ml 100 µg/ml	GIBCOBRL	15240-062

## 2. SOQUES BACTERIANES

Per a la realització d'aquesta tesi doctoral només s'ha utilitzat una soca bacteriana derivada d'*Escherichia coli* (*E. coli*).

Taula 1. Soca bacteriana d' *Escherichia coli* (*E. coli*) utilitzada

SOCA	GENOTIP	CARACTERÍSTIQUES	PROVEÏDOR
TOP 10	<i>F- mcrA Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC)</i> <i>Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Soca comercial optimitzada pel clonatge de tot tipus de plasmidis. Presenta una elevada eficiència transformació. Permet fer selecció blau-blanc sense haver d'afegir IPTG	INVITROGEN

## 3. VECTORS I CONSTRUCTES

### 3.1. VECTORS

A continuació es mostren els vectors utilitzats en aquest treball amb les seves característiques principals.

#### 3.1.1. Vector mU6pro (Yu J.Y. et al., 2002)

Vector d'expressió de shRNA (*small hairpins* RNA) en cèl·lules de mamífer. L'expressió dels shRNA es troba sota el control del promotor mU6pro, basat en la RNA polimerasa III (FIGURA 22). El clonatge té lloc entre *Bbs* I i *Xba* I. Aquest vector ha estat amablement cedit pel Dr. David L. Turner.

#### 3.1.2. pEGFP-C3

Vector d'expressió en cèl·lules de mamífers de proteïnes de fusió amb la GFP (*Green Fluorescence Protein*) en posició N-terminal. La presència del SV40 assegura uns nivells d'expressió elevats en la majoria de línies cel·lulars (FIGURA 22).

#### 3.1.3. pSilencer™ 4.1-CMV Hygro (AMBION)

Vector d'expressió de siRNA (*small interfering* RNA). L'expressió del siRNA es troba sota el control del promotor CMV, permetent una expressió constitutiva forta a una gran varietat de tipus cel·lulars. Conté el gen higromicina que permet la selecció dels clons estables per a la transfecció (FIGURA 22).

Aquest vector està linealitzat amb *Bam*H I i *Hind* III per tal de facilitar el clonatge direccional.

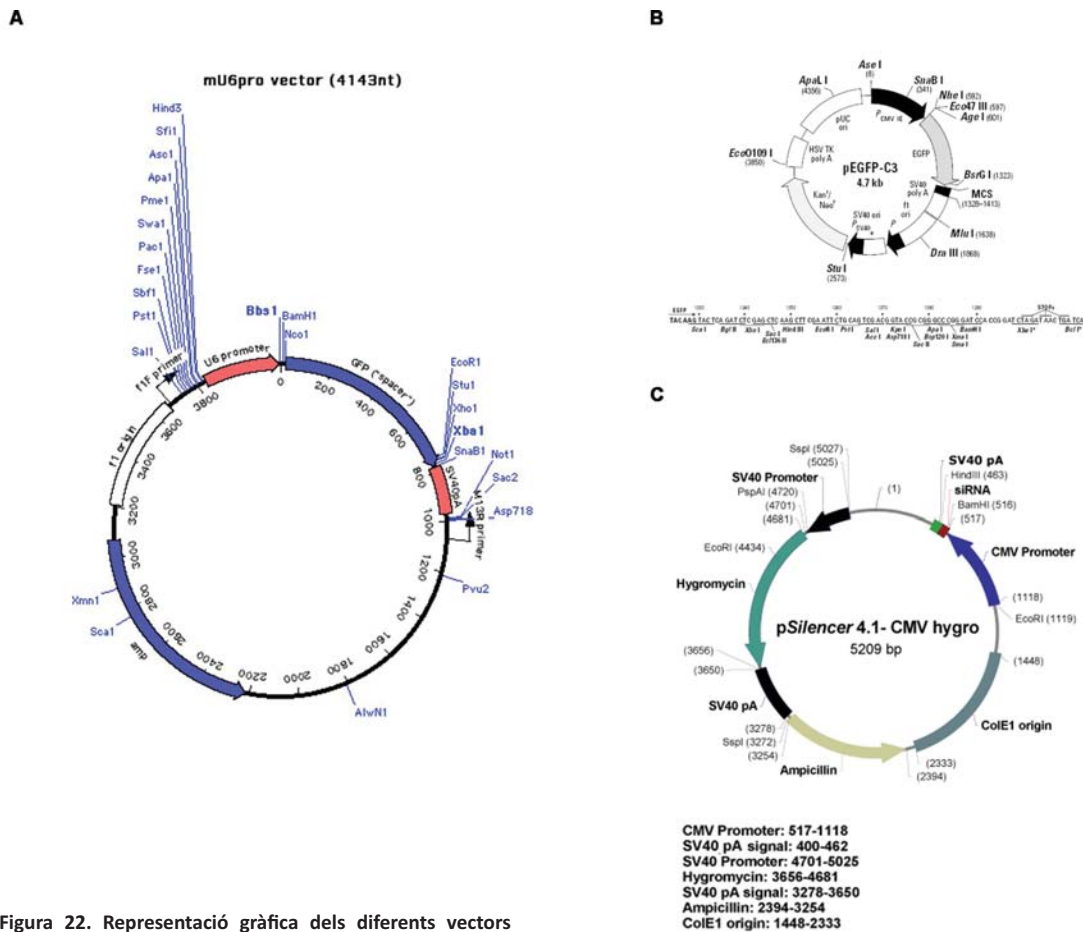


Figura 22. Representació gràfica dels diferents vectors d'expressió.

### 3.2. CONSTRUCTES

A continuació es mostren les diferents construccions utilitzades en aquest treball. En tots els casos s'han seguit les indicacions especificades en els diferents apartats de MÈTODES.

Taula 2. Detall dels constructes utilitzats en aquest treball

CONSTRUCTE	CLONAT A
mU6CypA	mU6pro digerit amb <i>BbsI</i> i <i>XbaI</i>
mU6CypB	mU6pro digerit amb <i>BbsI</i> i <i>XbaI</i>

## 4. OLIGONUCLEÒTIDS

### 4.1. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DELS siRNA

Per a la transfecció transitòria dels siRNA es posen a punt dos protocols. En primer lloc es produeix el silenciament gènic mitjançant l'expressió de *hairpins* de RNA en cèl·lules de mamífer i en segon lloc el silenciament gènic s'aconsegueix mitjançant la introducció a l'interior de la cèl·lula de petites molècules de RNA doble cadena (siRNA)

#### 4.1.1. Small hairpin RNA (shRNA)

Pel disseny dels *hairpins* de RNA es segueixen les recomanacions publicades pel grup del Dr. David L. Turner i col·laboradors al 2002.

Taula 3. Oligonucleòtids utilitzats per la síntesi dels shRNA transfectats transitòriament

NOM	SEQÜÈNCIA (5'- 3') <sup>a</sup>	ORIENTACIÓ
CypA <i>up</i> ( <i>hairpin</i> )	ttgTCAGTCTTGGCAGTGCAGATATTATCTGCACTGCCAAGACTGATTTTT	Fwd
CypA <i>low</i> ( <i>hairpin</i> )	ctagAAAAATCAGTCTTGGCAGTGCAGATAATATCTGCACTGCCAAGACTGA	Rev
CypB <i>up</i> ( <i>hairpin</i> )	ttgGAGGTCTTGACTGTGGTTATGAAGCATAACCACAGTCAAGACCTCTTTTT	Fwd
CypB <i>low</i> ( <i>hairpin</i> )	ctagAAAAAGAGGTCTTGACTGTGGTTATGCTTCATAACCACAGTCAAGACCTC	Rev

<sup>a</sup> les dianes de restricció estan escrites en minúscula. Subratllades en posició 3', les 5 T necessàries per a la terminació de la RNA polimerasa III. CypA = ciclofilina A, CypB = ciclofilina B

#### 4.1.2. siRNA de doble cadena

Les parelles d'oligonucleòtids utilitzades per a la síntesi dels siRNA han estat dissenyades seguint les instruccions recomanades per la casa comercial AMBION, a través de la següent pàgina web: [www.ambion.com/techlib/msic/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/msic/siRNA_finder.html) (siRNA Target Finder).

Taula 4. Oligonucleòtids utilitzats per a la síntesi dels siRNA

NOM	SEQÜÈNCIA (5'- 3') <sup>a</sup>	ORIENTACIÓ
CypA1 <i>up</i>	AAAACCTTTCGAGCTCTGAGCA	Fwd
CypA1 <i>low</i>	AATGCTCAGAGCTCGAAAGTT	Rev
CypA2 <i>up</i>	AAACACAAACGGTTCCCAGTT	Fwd
CypA2 <i>low</i>	AAAACCTGGGAACCGTTTGTGT	Rev
CypA3 <i>up</i>	AAACCATTCTTCTGTAGCTC	Fwd
CypA3 <i>low</i>	AAGAGCTACAGAAGGAATGGT	Rev
CypB1 <i>up</i>	AAGAAGAAGGGACCTAAAGTC	Fwd
CypB1 <i>low</i>	AAGACTTTAGGTCCCTTCTTC	Rev
CypB2 <i>up</i>	AATGCAGGCAAAGACACCAAT	Fwd
CypB2 <i>low</i>	AAATTGGTGTCTTTGCCTGCA	Rev
CypB3 <i>up</i>	AAAACCTACCAATGCTGATCAA	Fwd
CypB3 <i>low</i>	AATTGATCAGCATTGGATGTT	Rev

<sup>a</sup> A l'extrem 3' de l'oligonucleòtid s'afegeixen 8 nucleòtids complementaris a la sonda T7 (5'-CCTGTCTC-3')

#### 4.2. TRANSFECCIÓ ESTABLE DELS siRNA

El disseny dels *hairpins* siRNA per a la transfecció estable, es fa seguint les instruccions recomanades per la casa comercial AMBION que trobem a les següents webs: [www.ambion.com/techlib/msic/psilencer\\_converter.html](http://www.ambion.com/techlib/msic/psilencer_converter.html) i [www.ambion.com/techlib/msic/siRNA\\_design.html](http://www.ambion.com/techlib/msic/siRNA_design.html).



Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats per la síntesi dels shRNA transfectats de forma estable

NOM	SEQÜÈNCIA (5' - 3') <sup>a</sup>	ORIEN-TACIÓ
CypA <i>upper</i>	gatccAACTTTTCGAGCTCTGAGCATT <b>CAAGAGAT</b> GCTCAGAGCTCGAAAGTTTta	<i> fwd </i>
CpA <i>lower</i>	agcttAAAACCTTTTCGAGCTCTGAGCAT <b>TCTTTGAAT</b> GCTCAGAGCTCGAAAGTTg	<i> rev </i>
CypB <i>upper</i>	gatccGAAGAAGGGACCTAAAGTCT <b>CAAGAGAGACT</b> TTAGGTCCCTTCTTCTTa	<i> fwd </i>
CypB <i>lower</i>	agcttAAGAAGAAGGGACCTAAAGTCT <b>TCTTTGAAGACT</b> TTAGGTCCCTTCTTCg	<i> rev </i>

<sup>a</sup> en minúscula les dianes de restricció afegides al primer. En negreta els loops afegits a l'oligonucleòtid.

## 5. REACTIUS QUÍMICS

Els principals subministradors dels reactius i productes químics utilitzats són les cases comercials: BOEHRINGER-MANHEIM/ROCHE, MERCK, SIGMA, PANREAC, ECOGEN, BIO-RAD i FULKA, entre d'altres.

## 6. INSTRUMENTS I APARELLS

Taula 6. Noms i models dels principals aparells utilitzats

CATEGORIA	APARELL	FABRICANT	MODEL
Grans Aparells	Autoclaus	SELECTA	
		MATACHANA	
	Seqüenciador Automàtic	PERKIN ELMER	ABI PRISM 310 Molecular Analyser
	PCR Quantitativa a temps real	APPLIED BIOSYSTEMS	7500 REAL TIME PCR SYSTEM
	Reveladora		
	Grans centrifugues	SORVALL	
SORVALL			RC5C
Congeladors i Neveres	Ultracongeladors (-80°C)	FORMA	
		REVCO	
	Nevera/congeladors (-20°C)	LIEBHERR	
Cultius	Campanes de flux	TELSTAR	BIO IIA
			AV-30/70
	Incubadores de CO2	THERMO	IGO 150 cell life
		FORMA	SCIENTIFIC
	Contenidors de N2(l)	LERY-FRANCE	BR 2100 CRYO DIFUSION
		KOOL-KAN	NU-7110
AIR-LIQUIDE		ARPEGE 170	

Centrífugues de sobretaula	Centrífugues refrigerades	HERAEUS	SEPATECH
		EPPENDORF	5415R
	Microfugues	SIGMA	112
		BECKMAN	MICROFUGUE E™
		HETTICH	EBA 12
Sistemes de purificació d'H <sub>2</sub> O	Font d'aigua destil·lada	MILLIPORE	MILLI-Ro®
	Font d'aigua bidestil·lada	MILLIPORE	MILLI-QPLUS
Material d'electroforesi	Cubetes	ECOGEN	diferents gràndaries
		BIO-RAD	MINI SUB-CELL® CELL GT
		BIO-RAD	SUB-CELL® CELL GT
		GE-HEALTHCARE	ETTAN DALT SIX ELECTROPHORESIS
		LIFE TECHNOLOGIES	S2
	Fonts d'electroforesi	PHARMACIA	LKB-GPS 200/400
		PHARMACIA	Eps 500/400
		BIO-RAD	POWER PAC 300
		BIO-RAD	EPS-601
		Consort	E741
	Unitat refrigeradora	BIO-RAD	Multitemp II
Fonts de calor	Estufes	MEMEMRT	
		HERAEUS (37°C)	
	Banys d'aigua termostatitzats	THERMOMIX MM B. BRAUN	
		AQUA SHAKER	ADOLF KÜHNER AG
		GRANT	
	Plaques calefactores/ agitadors magnètics	P SELECTA	TERMOBLOC
		THERMOLINE	NUOVA II STIRPLATE
		HEIDOLF	MR 2002
	Forns d'hibridació	HYBAID	
		ECOGEN	
	Agitadors	<i>Shaker</i>	ADOLF KÜHNER
Agitador orbital		LUCKHAM	CM100
Vórtex		HEIDOLPH	REAX000
Microscòpia	Microscopi òptic	OLIMPUS	Bx40
	Microscopi invertit	LEICA	
	Microscopi confocal invertit	LEICA	DMIRBE
Espectrofotòmetres i altres aparells d'analítica	Espectrofotòmetre UV-VIS	UBIKON	
	Espectrofotòmetre UV	PHARMACIA	GENE QUANT II
	Lector plaques ELSIA	ANTHOS	HT II
Termocicladors	<i>peltier</i>	MJ RESEARCH INC.	PTC-100
	<i>block</i>	PERKIN ELMER	GENEAMP PCR SYSTEM 2400
Varis	Màquines de gel	ICEMATIC	F125 COMPACT
		SCOTSMAN	AF20